



TITLE:

Accurate diagnosis of mismatch repair deficiency in colorectal cancer using high-quality DNA samples from cultured stem cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Yamaura, Tadayoshi

CITATION:

Yamaura, Tadayoshi. Accurate diagnosis of mismatch repair deficiency in colorectal cancer using high-quality DNA samples from cultured stem cells. 京都大学, 2019, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21686>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	山浦 忠能
論文題目	Accurate diagnosis of mismatch repair deficiency in colorectal cancer using high-quality DNA samples from cultured stem cells （患者由来の大腸がん幹細胞から得た高品質 DNA によるミスマッチ修復欠損に対する正確な診断検査法）		
（論文内容の要旨）			
ミスマッチリペア（MMR）機構欠損によるマイクロサテライト不安定性（MSI）大腸癌への免疫チェックポイント阻害薬は2018 年末に本邦でも保険承認され、普及が予想される。MSI の診断はホルマリン固定（FFPE）組織由来の DNA 検体が主流であるが、これは組織の状態、ホルマリンによる DNA 損傷、癌組織への正常間質細胞の混入などの影響が問題とされてきた。近年、スフェロイドと呼ばれる患者由来の初期継代培養された正常上皮または癌幹細胞を効率的に作成する技術が確立された。特に、癌細胞スフェロイドからは正常間質細胞の混入やホルマリンの影響がない純粋で高品質な DNA 検体が得られる。本研究ではスフェロイド DNA による MSI 大腸癌の診断検査を行い、妥当性、信頼性を検討した。			
対象は2015 年1 月から約3 年間の京都大学医学部附属病院の大腸癌 111 例（110 患者）で、原発巣の切除標本から正常腸管上皮、癌幹細胞スフェロイドを樹立し、DNA を抽出した。これらで PCR 産物の電気泳動での MSI 検査、次世代シーケンサーでの癌細胞の遺伝子変異量、腫瘍関連遺伝子（ <i>TGFB2</i> , <i>BAX</i> , <i>IGF2R</i> , <i>CASP5</i> ）における翻訳領域内の反復配列のダイレクトシーケンス解析を行った。また原発巣とスフェロイドの FFPE 切片で MMR 蛋白の免疫染色を行った。最後に 50 例でスフェロイド由来と FFPE 組織由来の DNA での各検査を比較した。			
MSI 検査では、スフェロイド DNA により解像度が高くノイズが少ない電気泳動図が得られ、7 例の MSI-high (MSI-H) 大腸癌（6. 4%）を認めた。これは後の DNA 解析の結果とも一致した。			
次に、スフェロイド DNA で癌細胞の変異量を MSI-H の 7 例、マイクロサテライト安定 (MSI-L/MSS) の 11 例で測定した。既知の通り、変異量は MSI-H が MSI-L/MSS よりも有意に高くなった。また、今回は変異の同定と多型の排除にデータベースを使用した。これらには同一患者の正常細胞の結果を使うのが一般的だが、2 倍のコストを要する。検証のため 2 例で両者を比較したが、ほぼ同様の結果であった。さらに、2 例で FFPE 組織 DNA の結果と比較したところ、変異量はほぼ同等であったが、FFPE 組織 DNA は変異の遺伝子頻度が低く、信頼度に欠ける結果となった。			
腫瘍関連遺伝子のシーケンス解析では、スフェロイドの DNA は正常間質細胞の混入がないため、変異がホモかヘテロ接合型かが判定できた。この解析で <i>TGFB2</i> は MSI 全 7 例で変異を認めた。			
また、全 111 例で免疫染色の結果と比較し、1 例の MSS 症例で MMR 機構の欠損を認めた。追加検査にて、原発巣の一部では MMR 機構が保持されており、同癌からの独立した 2 系統のスフェロイドも MMR 機構の保持と欠損に分かれた。だが、DNA 解析は両者とも MSI-L/MSS であった。これは術前治療の白金製剤によるメチル化で MMR 機構が欠損したものの、変異が蓄積していない状態と考えた。免疫治療の適応での DNA 検査の利点を示唆する 1 例となった。			
FFPE 組織 DNA との比較では、FFPE 組織 DNA での MSI 検査で DNA の品質に起因する解像度低下で 3 例の偽陰性と 1 例の偽陽性があり、ダイレクトシーケンスでもスフェロイド DNA と比べ変異の検知に感度の低下を認めた。これは正常間質細胞の混入が原因と考えた。			
本研究は少数のため統計学的な優位性は示せないが、MSI 診断におけるスフェロイドの利点は確認できた。スフェロイドを使用することで、より正確な癌の個別化診断が可能になると考える。			

（論文審査の結果の要旨） マイクロサテライト不安定性（MSI）を有する固形癌に対する免疫チェックポイント阻害薬の有効性が明らかとなり、正確なMSI診断が重要となってきた。現在主流のホルマリン固定（FFPE）組織標本に比べ、スフェロイドと呼ばれる患者由来がん幹細胞は正常間質細胞を含まず、十分量の癌細胞を有し高品質なDNA検体を提供できる。今回申請者は、スフェロイドDNAによる大腸癌のMSI診断の妥当性、信頼性を検討した。対象は2015年1月から3年間の京都大学医学部附属病院の大腸癌111例で、原発巣切除標本から正常腸管上皮とがん幹細胞スフェロイドを樹立した。これらのDNAで電気泳動によるMSI解析をし、7例（6.3%）のMSI大腸癌を検知した。これは、腫瘍関連遺伝子のダイレクトシーケンス解析、遺伝子変異量解析の結果と一致した。また、スフェロイドと原発巣でミスマッチ修復蛋白の免疫染色を行ったところ、変異蓄積のないミスマッチ修復機構欠損例が確認された。これは免疫治療適応診断でのDNA検査の利点を示唆する症例となった。最後に、50例で同一症例のFFPE組織からのDNAによる解析結果と比較した。FFPE組織DNAではDNAの質に起因する診断精度の低下を認め、FFPE組織に対するスフェロイドの有用性が確認された。 以上の研究はがん幹細胞を用いたMSI診断の臨床応用可能性を示し、がん個別化医療の発展に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 31 年 2 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日以降